



REC'D 03 NOV 2004

WIPO PCT

R004/12

ROMÂNIA

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII ȘI MĂRCI

CERTIFICAT DE PRIORITATE

Solicitant: INSTITUTUL ONCOLOGIC PROFESOR DR. AL. TRESTIOREANU, BUCUREȘTI, RO

Cerere de brevet de inventie nr.: a 2003 00685

Data de depozit: 13.08.2003

Titlul inventiei: METODĂ PENTRU STABILIREA IN VIVO, LA ANIMALE DE EXPERIENȚĂ, A CONCENTRAȚIEI EFICIENTE DE APĂ Sărăcită în Deuteriu Pentru Tratamentul Cancerului

Certificăm că documentația anexată, în număr de 15 file, este copia descrierii, revendicărilor și desenelor din cererea de brevet de inventie așa cum a fost depusă la Oficiul de Stat pentru Inventii și Mărci.

Director General

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



BEST AVAILABLE COPY

37

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE



Nr. referință solicitant/mandatar	Registratura OSIM (numărul și data primirii)
6135/11.08.2003	A/00685-13.08.2003

Se completează de către OSIM	
Numărul cererii de brevet de invenție	2003 00685
Data primirii în Registratura Generală a OSIM – R.4(5)	
Data de depozit – R.8(1)	13.08.2003
Data primirii părții lipsă la Registratura Generală A OSIM – R.(4)(7),(8)	
Data de depozit nouă – R.8(1)	
Data primirii cererii de retragere a părții lipsă la Registratura Generală a OSIM – R.4(14)	
Data de depozit atribuită cererii de brevet – R.8(14)	

1. Solicitanți (nume/denumire, adresă/sediu)
INSTITUTUL ONCOLOGIC „Prof. Dr. Al.Trestioreanu” BUCUREȘTI
Șos. Fundeni nr.252, sector 2, București
Tel/fax: 021/2406160

2. Solicităm în baza Legii nr. 64/1991, republicată în temeiul Legii nr. 203/2002, un brevet pentru invenția cu titlu:
„ Metodă pentru stabilirea in vivo, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă săracită în deuteriu pentru tratamentul cancerului”
2.1. Referință la o cerere anterioară (număr, dată de depozit, țara/oficiu):

3. Declarăm că inventatorii sunt: <input type="checkbox"/> aceeași cu solicitanții conform tabelului <input checked="" type="checkbox"/> persoanele din declarația anexată (nume, prenume și loc de muncă)

4. Declarăm că invenția conține informații care au fost clasificate de către (denumirea, data și nivelul clasificării):

5. Rezumatul se publică împreună cu figura numărul:

6. Priorități revendicate (stat, dată depozit, număr):

8. Cererea de brevet este divizionară din cererea (număr cerere, dată depozit): 36

9. Proceduri solicitate la data depunerii cererii:

9.1. Publicarea de urgență a cererii, conform art. 23, alin. 3
9.2. Întocmirea unui raport de documentare, conform art. 24
9.3. Examinarea cererii cu luarea hotărârii în termen de 18 luni de la data de depozit, conform art. 24
9.4. Menținerea informațiilor la nivelul de clasificare atribuit, conform regulii 7

10. Solicitantul desemnat pentru corespondență cu OSIM:

11. Adresa solicitantului/mandatarului pentru corespondență cu OSIM: Agenția Universitară de inventică-INVENTA SRL, B-dul C. Coposu nr.7, Bl.104, sc.2, ap.31, sector 3, București

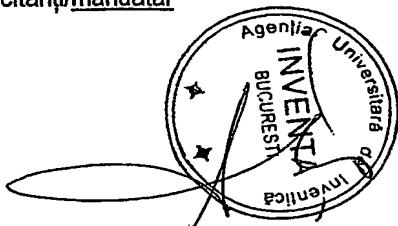
12. Reprezentare prin mandatar autorizat cu: procură procură generală nr./dată

L.S.

13. Semnături solicitanții/mandatar

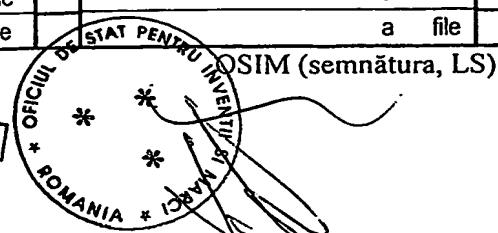
Doina Tuluca

Director



14. Documente depuse la OSIM de solicitant/mandatar		15. Documente primite la OSIM
14.1. Formular de cerere	în exemplare, a file	în exemplare, a file
14.2. Descriere	în exemplare, a file	în exemplare, a file
14.3. Revendicări	în exemplare, a file	în exemplare, a file
14.4. Desene	în exemplare, a file	în exemplare, a file
14.5. Rezumat	în exemplare, a file	în exemplare, a file
14.6. Lista de secvențe de nucleotide și/sau aminoacizi, parte a descrierii		
14.6.1. prezentată pe suport de hârtie	în exemplare, a file	în exemplare, a file
14.6.2. prezentată pe suport electronic	tip , în exemplare	tip , în exemplare
14.7. Document privind dreptul la acordarea brevetului		
14.8. Document privind desemnarea inventatorilor	a file	a file
14.9. Procură/copie procură generală	a file	a file
14.10. Document referitor la plata taxelor	a file	a file
14.11. Act privind acordarea reducerii taxelor	a file	a file
14.12. Autorizația privind transmiterea dreptului de prioritate	a file	a file
14.13. Act de prioritate	a file	a file
14.14. Act referitor la depozitului microorganismului/materialului biologic	a file	a file
14.15. Document privind o divulgare a invenției, conform art. 9 din lege	a file	a file
14.16. Copie/traducere a cererii anterioare de la rubrica 2.1.	a file	a file
14.17. Alte documente	a file	a file

STELA DITĂ



Continuarea rubricii nr. 2.

Invenția a fost creată în condițiile art.5 alin.2, în baza contractelor de cercetare nr.1648/23.04.2001 și nr. 2450 Bis/18.06.2002 încheiate între Institutul Oncologic „Prof. Dr. Al. Trestioreanu” București și Regia Autonomă pentru Activități Nucleare, Drobeta Tr. Severin.

35

Continuarea rubricii nr. ...

Continuarea rubricii nr. ...

Continuarea rubricii nr. ...

Continuarea rubricii nr. ...

35

Declarația

conținând desemnarea inventatorilor invenției cu titlul:

„Metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animalele de experiență, a concentrației eficiente de apă săracită în deuteriu pentru tratamentul cancerului”

Această declarație este făcută în conformitate cu prevederile art. 14 alin. 2 și Regulii 20E și trebuie depusă în termen de 18 luni de la data solicitării examinării în fond a cererii de brevet de invenție, conform Regulii 20E. alin. (11)

1) Nume și prenume : Nicolae MANOLESCU

Adresă : București, Bd. Tudor Vladimirescu nr.82, Bl.133, sc.1, ap.1, sector 5

Locul de muncă la data creării invenției : Facultatea de Medicină Veterinară București, Institutul Oncologic București

2) Nume și prenume : Ion BĂLĂNESCU

Adresă : București , Str. Bulgăruș nr.71, sector 5

Locul de muncă la data creării invenției : Institutul Oncologic București

3) Nume și prenume : Șerban Constantiin VALECA

Adresă : Pitești, Calea Craiovei, Bl.2, sc.A, ap.9

Locul de muncă la data creării invenției : Universitatea Pitești

4) Nume și prenume : Rodin TRAICU

Adresă : Drobeta Tr. Severin, Str. Matei Vasilescu nr.53,

Locul de muncă la data creării invenției : Regia Autonomă pentru Activități Nucleare, Drobeta Tr. Severin

5) Nume și prenume: Dumitru MĂRCULESCU

Adresă : Comuna Cerneți, Jud. Mehedinți

Locul de muncă la data creării invenției: Regia Autonomă pentru Activități Nucleare, Drobeta Tr. Severin

6) Nume și prenume: Petru NICULITĂ

Adresă: București, Bd.Iancu de Hunedoara nr.4, ap.7, sector 3

Locul de muncă la data creării invenției: Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, București

7) Nume și prenume : Ioan ȘTEFĂNESCU

Adresă : Râmnicu Vâlcea, Bd.Nicolae Bălcescu nr.4

Locul de muncă la data creării invenției : Regia Autonomă pentru Activități Nucleare, Drobeta Tr. Severin

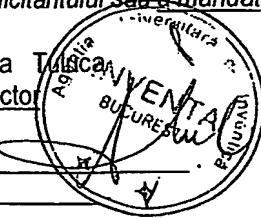
8) Nume și prenume : Ioan TERBEA

Adresă : București, Str. Al.Stănilă nr.2, Bl. H12, Sc.4, ap.7, sector 3

Locul de muncă la data creării invenției : Institutul Oncologic București

Alți inventatori sunt înscrisi în pagina următoare

Semnătura solicitantului sau a mandatarului autorizat (numele și prenumele precum și calitatea persoanei cu capacitate de reprezentare a solicitantului sau a mandatarului autorizat) :

Doina TĂUSCAN
Director
Institutul Oncologic București
Semnătura : 
L.S. _____

Data : 12.08.2003

9) Nume și prenume : Victoria MORARU

Adresă : București, Bd.1 Decembrie 1918 nr.38, Bl. U4, Sc.A, ap.4

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

10) Nume și prenume : Virgiliu COMIȘEL

Adresă : București, Str. Vaporul lui Assan nr.4, sc.2, ap.53, sector 2

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

11) Nume și prenume : Corneliu MATEESCU

Adresă : București, Str. Câmpia Libertății nr.64, Bl.34, sc.C, ap.115, sector 3

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

12) Nume și prenume : Ioan ENCUT

Adresă : București, Sos.Colentina-nr.26, Bl.64, sc.A, ap.11, sector 2

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

13) Nume și prenume : Marieta PANAIT

Adresă : București, Str. Șapte Drumuri nr.18, Bl. PM40, sc.A, ap.16, sector 3

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

14) Nume și prenume : Daniela BEGU

Adresă : București, Str. Bărbat Voievod nr.17, sector 2

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

15) Nume și prenume : Sabin CINCA

Adresă : București, Str. Doamna Ghica nr.3, Bl.2, sc.2, ap.50, sector 2

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

16) Nume și prenume : Maria-Iuliana GRUIA

Adresă : București, Bd. Basarabia nr.244, Bl. MY8, ap.19, sector 3

Locul de muncă la data creării inventiei : Institutul Oncologic București

17) Nume și prenume : Emilia BALINT

Adresă : Comuna Măgurele, jud. Ilfov, Str. Mărășești nr.1, Bl.17, sc.B, ap.17

Locul de muncă la data creării inventiei : Facultatea de medicină Veterinară București

18) Nume și prenume : Aneta POP

Adresă : București, Str. Lt.Gh.Saidic, Bl.24, ap.54, sector 6

Locul de muncă la data creării inventiei : Facultatea de medicină Veterinară București

Semnătura solicitantului sau a mandatarului autorizat (numele și prenumele precum și calitatea persoanei cu capacitate de reprezentare a solicitantului sau a mandatarului autorizat) :

Doina Tulgă
Director



Semnătura :
L.S.

Data : 12.08.2003

10

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. a2003 00685
Data depozit ..13.08.2003

Metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă săracită în deuteriu pentru tratamentul cancerului

Invenția de față se referă la o metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă săracită în deuteriu pentru tratamentul cancerului, metodă ce poate fi aplicată în oncologia experimentală.

Sunt cunoscute procedee și instalații pentru obținerea apei săracite în deuteriu din apă naturală sau apă provenită din apă grea(Brevet de invenție RO 112422, Cerere de brevet de invenție FR 2 552 324, Cerere Internațională PCT WO 96/33129, Brevet de invenție RU 2 182 562).

De asemenea sunt cunoscute proprietățile apei săracite în deuteriu în ceea ce privește ameliorările și vindecările diferitelor boli, inclusiv a cancerului , atunci când această apă este administrată pacienților fie ca atare, fie sub forma unor preparate farmaceutice sau cosmetice(US 5.788953, WO 96/03996, WO 95/18545).

Din stadiul tehnicii rezultă că, este cunoscută o metodă experimentală *in vivo* de stabilire a dozelor necesare de apă săracită în deuteriu pentru tratamentul cancerului(US 5.788953), dar această metodă prezintă numeroase dezavantaje. Astfel, în metoda descrisă sunt utilizate tumorii umane (tumoră de prostată, tumoră a sănului etc) grefate la animalele imunosuprăse. Această xenotransplantare(tumoră umană grefată la animale) a fost obținută pe linii de șoareci singeneici (inbred) și anume linia pură CBA/Ca, animalele fiind în prealabil imunosuprăse(WO95/18545-pag 3).

Este cunoscut însă că, la transplantarea tumorilor maligne umane la animale există foarte frecvent riscul de respingere(Billingham, R.E. și colab., 1953, Nature, 172, 603; Miles,C.P., 1965, J.Natl. Cancer Inst. 34, 103; Comișel, V. și colab, 2001, Rev. Rom. De Oncologie Comparată, 4, 295).

Este deja bine cunoscut faptul că, xenotransplantarea de celule, țesuturi și organe este extrem de greu de obținut, aproape imposibil, xenotransplantul fiind rejectat în timp de către organismul gazdă. De asemenea, sunt rejectate și grefele tumorale maligne în sistem xenogenic. În ceeace privește xenotransplantarea tumorilor, în general, și a tumorilor maligne în special, la animalele de experiență, există numeroase lucrări științifice publicate în care se prezintă și se discută condițiile facilitante pentru reușita xenotransplantării tumorale, cum sunt:

a) folosirea unor tehnici deosebite de inoculare a celulelor tumorale(inocularea intraembrionară, intracraniană la puii nou născuți, intratesticulară, în camera anteroioară a ochiului, sub capsula renală, în punga jugală a hamsterului etc).Xenotransplantarea



tumorilor în aşa zisele sedii privilegiate a demonstrat însă că procentul de grefe pozitive este neconcludent și variabil, nepuțând oferi un model experimental constant și reproductibil (Comișel, V. și colab, 2001, Rev. Rom. de Oncologie Comparată, 4, 295)

b) folosirea animalelor cu imunodeficiențe congenitale sau dobândite (șoareci „nude” homozigoți, atimici congenital, caracterizați printr-o deficiență a răspunsului imun mediat celular, timectomia chirurgicală a animalelor nou-născute.

c) inhibarea reactivității imune pentru inducerea toleranței specifice față de xenotransplant prin diverse metode cum sunt: iradierea cu doze subletale sub protecție cu antibiotice; blocarea sistemului imun prin inoculare intravenoasă cu doze masive de suspensii coloidale; administrarea de steroizi corticosuprarenali sau seruri antilimfocitare sau medicamente imunosupresoare (ciclofosfamidă, cytostar etc) sau ciclosporină. Mijloacele cunoscute de producere a imunosupresiei la animale care urmează să fie supuse xenotransplantărilor tumorale maligne s-au dovedit a avea efecte nocive asupra stării de sănătate a animalelor imunosuprate, stare care influențează rezultatele testelor experimentale (Comișel, V. și colab, 2001, Rev. Rom. de Oncologie Comparată, 4, 295).

De asemenea, aplicarea unui tratament de supresie imunologică înainte de efectuarea transplantului face ca, ulterior transplantului, în timpul experimentului de stabilire a dozei eficiente de apă sărăcită în deuteriu, efectul dozei să nu fie cel real, animalul supresat imunologic are reacții total diferite în comparație cu un animal normal; nu reacționează sau reacționează extrem de slab imunologic.

Un alt aspect important legat de xerotransplantare este acela că, animalele imunosuprate își redobândesc capacitatea de respingere a grefei de țesut normal sau tumoral malign după o perioada de 4-6 săptămâni, indiferent de modul de inducere a imunosupresiei.

În experimentele prezentate în brevetul US 5.855921 se precizează că tumorile maligne umane xenotransplantate la șoareci și dezvoltate la aceștia, după o perioadă de tratament cu apă sărăcită în deuteriu au regresat și apoi au fost rejectate datorită acestui tratament. Dar în acest caz, rejectarea poate fi pusă pe seama unei reacții imunologice normale: gazdă contra grefă tumorală, aşa cum a fost arătat mai sus.

De asemenea precizarea că, tumorile maligne xenotransplantate la animale și tratate apoi cu apă sărăcită în deuteriu nu metastazează nu poate fi luată în considerare ca efect al administrării apei deoarece aşa cum s-a arătat mai sus tumorile maligne umane transplantate experimental nu metastazează, sau metastazează foarte rar.

În brevetul US 5 855 921 dozele de deuteriu în apă administrată în experiment nu sunt constante, astfel încât să se poată urmări stabilirea unei doze singulare eficiente. Astfel, în cursul experimentului se administrează pentru început apă cu un conținut de 30 ppm deuteriu, timp de 3 săptămâni, iar apoi, la același lot de animale, se administrează apă cu un conținut de deuteriu de 110-120 ppm, până la sfârșitul experimentului. În acest fel este construită plaja concentrațiilor de deuteriu revendicată în brevetul US 5 855 921.

Având în vedere cele de mai sus se poate constata că experimentele din stadiul tehnicii prezentate de invențiile a căror autor este Gabor Somlayi, sunt neconvigătoare deoarece



8

pentru xenotransplantarea folosită rezultatele obținute sunt influențate de condițiile în care experimentele au fost efectuate, respectiv modalitatea de administrare a dozelor pe o plajă prea mare și folosirea tumorilor umane în cazuri în care a fost folosită în prealabil imunosupresarea animalelor de experiență. De asemenea, din experimentele prezentate în brevetul US 5.855.921 nu rezultă durata totală pentru tratamentului cancerului, respectiv nu este indicată durata și concentrația pentru care efectele sunt maxime.

Problema tehnică pe care inventia o rezolvă este realizarea unei metode de stabilire experimentală in vivo a concentrației eficiente de deuteriu în apă, astfel încât să se obțină rezultate optime în tratamentul cancerului la şobolani.

Metoda conform invenției constă în administrarea apei sărăcită în deuteriu înainte și după grefarea tumorală cu grefe tumorale animale și are următoarele etape:

- A) administrarea şobolanilor Wistar outbred prin dietă a apei sărăcită în deuteriu la concentrațiile de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animale martor cărora le-a fost administrată prin dietă apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu pe aceeași durată (apă de la rețea)
- B) Stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate, cu albastru de tripan
- C) Grefarea animalelor din lotul de experiență și animalelor martor, în a 60-a zi, subcutan, cu 1×10^7 celule tumorale maligne în 0,5 ml ser fiziologic de sarcom Walker 256- varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guérin-variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%.
- D) Administrare continuă și de lungă durată, prin dietă a apei sărăcită în deuteriu la concentrații de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm deuteriu, perioadă în care se efectuează următoarele:
 - a) începând cu ziua a 4-a post-grefare se execută la 2-3 zile controlul și măsurarea nodulilor tumorali
 - b) urmărirea stării fiziologice a animalelor prin cântărire săptămânală, urmărirea consumului hranei și al apei, observarea apariției toxicității
 - c) după 60 de zile, când toate animalele martor au decedat, de preferință între ziua 160-200 de la grefare, se urmărește efectul produs de administrarea apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun umoral și celular al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor și anume: analiza formulei leucocitare pentru stabilirea nivelului limfocitelor și a celulelor blastice; analize la nivelul măduvei hematopoietice pentru stabilirea nivelului plasmocitelor și nivelului celulelor NK-K
- E) Stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu pentru animalele de experiență rămase în viață funcție de instalarea noii homeostazi și rezultatele obținute privind regresia tumorală, vindecarea de cancer.



Avantajele metodei conform invenției sunt următoarele:

- este o metodă ce practică grefarea tumorală alogeneică care poate permite mai degrabă o eventuală extrapolare a rezultatelor la om decât rezultatele obținute de alți autori pe animale singeneice;
- permite stabilirea exactă a concentrației eficiente de deuteriu;
- rezultatele aplicării metodei sunt exacte și reproductibile, tumorile grefate în sistem alogeneic având un procent de prindere tumorală de 100%, fără regresii tumorale spontane;
- nu este efectuată supresia imunologică a animalelor ceea ce permite eliminarea unor rezultate fals pozitive;
- nu introduce nici un factor arbitrar în stabilirea concentrației de deuteriu;
- folosește tumori experimentale bine cunoscute de screening, folosite curent la aprecierea efectelor citostaticelor.

Se dă mai jos un exemplu de realizare a metodei conform invenției.

Metoda conform invenției constă în administrarea la animale de experiență (șobolani) a apei sărăcită în deuteriu, înainte și după grefarea tumorală cu grefe animale.

Metoda cuprinde următoarele etape:

A) Administrarea apei sărăcită în deuteriu înainte de grefarea tumorală

Se aleg cca 800 animale de experiență, respectiv șobolani Wistar outbred, masculi și femele, cu greutate de 120 ± 20 g, cu stare fiziologică bună constatătă în urma unui examen clinic.

Animalele de experiență au fost repartizate câte 7-8 într-o cușcă (masculii separați de femele).

Se administră pentru trei loturi de șobolani Wistar outbred prin dietă apă sărăcită în deuteriu la concentrațiile de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animale martor cărora le-a fost administrată prin dietă apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu pe aceeași durată (apă de la rețea).

B) Stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate.

Înainte de efectuarea grefelor se execută stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate, cu albastru de tripan. Pentru această determinare, pe o lamă de microscop se recoltează celule tumorale, obținute conform unor tehnici cunoscute, din tumoră alogeneică în 0,5 ml ser fiziologic și se adaugă 1-2 picături de albastru de tripan. Celulele colorate în albastru sunt celulele moarte. Calculul procentului de viabilitate se face prin numărarea celulelor moarte la 1000 celule etalate pe lamă și se raportează %.

Viabilitatea celulelor trebuie să fie de peste 98%.

C) Grefarea animalelor din lotul de experiență și animalelor martor cu sarcomul Walker 256-varianta solidă și cu epiteliomul limfotrop T8 Guerin- varianta solidă.



În a 60-a zi de la tratamentul preliminar al animalelor cu apă săracită în deuteriu conform punctului A) se procedează la grefarea şobolanilor din lotul de experiență cât și din lotul martor, prin tehnici bine cunoscute, subcutan, dorsal, cu 1×10^7 celule tumorale maligne în 0,5 ml ser fiziologic de sarcom Walker 256- varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guerin-variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%.

Grefarea s-a executat pe câte trei loturi de 220 animale ce urmează a li se administra apă săracită în deuteriu la trei concentrații, respectiv la 25 ppm, la 60 ppm și la 100 ppm.

Din fiecare lot de 220 animale de experiență, două loturi de 79 animale au fost grefate cu sarcomul Walker 256-varianta solidă și un lot de 79 animale au fost grefate cu epiteliomul T8 Guerin- varianta solidă.

Celelalte animale fiind folosite ca martori.

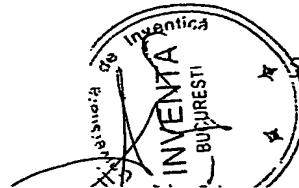
D) Administrare continuă și de lungă durată, prin dietă a apei săracită în deuteriu la concentrații de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm deuteriu comparativ cu administrarea la animalele martor a apei de la rețea cu conținut de deuteriu de 150 ppm.

Animalelor de experiență împărțite pe trei loturi li s-a administrat prin dietă zilnică apă săracită în deuteriu la trei concentrații: 30 ppm, 60 ppm și 100 ppm, timp de 700 zile.

Începutul administrării animalelor de experiență s-a făcut concomitent cu administrarea la animale martor, tot în dietă zilnică, a apei de la rețea cu un conținut de deuteriu de 150 ppm.

În perioada experimentului se efectuează următoarele :

- Incepând cu ziua a 4-a post-grefare se execută la 2-3 zile, la locul inoculului, controlul și măsurarea nodulilor tumorali dezvoltăți la animalele de experiență. Incidenta tumorală a fost la toate loturile de 100%. Creșterea tumorilor a fost apreciată prin măsurarea a două diametre: mare și mic, la diferite stadii ale creșterii tumorale. Volumul tumoral a fost calculat după formula $V = a \times b^2 \times 0,4$, în care V este măsurat în mm^3 , a și b sunt cele două diametre, iar 0,4 este o constantă.
- Zilnic, se efectuează urmărirea stării fiziologice a animalelor prin cântărire, urmărirea consumului hranei și al apei, observarea apariției fenomenelor toxice(hemoragii, diaree, căderea părului, etc). De asemenea, zilnic se efectuează înregistrarea mortalității. Animalele au fost cântărite la data efectuării măsurătorilor tumorale pentru că, scăderea bruscă în greutate poate fi o manifestare a fenomenelor toxice.
- După 60 de zile când toate animalele martor au decedat, de preferință între ziua 160-200 de la grefare, se urmărește efectul produs de administrarea apei săracită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun umoral și celular al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor și anume: analiza formulei leucocitare pentru stabilirea nivelului limfocitelor



5
și a celulelor blastice, inclusiv nivelul prezenței celulelor NK-K și al celulelor dendritice; analize la nivelul măduvei hematopoietice a teritoriilor limfonodate satelite zonei de grefare tumorală, inclusiv formațiunea tumorală grefată.

F) *Stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu pentru animalele de experiență rămase în viață funcție de instalarea unei noi homeostazi și de rezultatele obținute privind regresia tumorală și vindecarea de cancer.*

Aprecierea activității antitumorale a apei sărăcită în deuteriu s-a făcut conform criteriilor NCI(1990). S-a calculat inhibiția creșterii tumorale (ICT%), o valoare de 50% a acestui indice reprezentând o inhibiție puternică a creșterii tumorale.

Pentru supraviețuirea animalelor s-a calculat:

- timpul mediu de supraviețuire(TMS);
- raportul T/C(tratat/control x 100) care trebuie să fie mai mare de 125;
- creșterea timpului de supraviețuire (ILS%) care trebuie să aibă valoarea peste 25-36 în funcție de sistemul experimental folosit;
- calcularea numărului de animale supraviețuitoare pe termen lung față de numărul animalelor tratate.

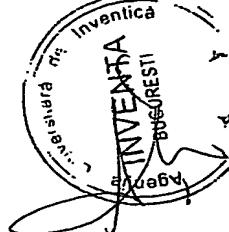
Au fost respectate procedurile standard pentru validarea GLP a modelelor experimentale utilizate în studiile farmacologice. Au fost respectate cele două variabile cerute de GLP: variabila independentă (de predicție), care constă în utilizarea a aceluiași număr de celule tumorale, inoculate în aceleași condiții standard la toate animalele (1×10^7 celule tumorale) și variabila dependentă (variabila de criteriu):

- perioada de latență(în zile de la transplantul tumoral până la apariția unui nodul tumoral palpabil);
- incidența tumorală- număr de animale cu tumori, fără tumori, rejecții tumorale;
- timpul mediu de supraviețuire (TMS în zile) de la grefarea tumorii până la moartea ultimului animal.

REZULTATE

Ca prim rezultat, este evidențiat faptul că există diferențe semnificative în ceea ce privește tumorigeneza și evoluția tumorală între martorii cărora li s-a administrat în dietă apă curentă de la rețea, pre- și post grefare tumorală și șobolanii cărora le-a fost administrată apă sărăcită în deuteriu, în special la concentrația de 60 ppm.

În ceea ce privește perioada de latență s-a constatat o lungire a acesteia cu 5 zile la loturile care au primit în dietă apă sărăcită în deuteriu cu concentrația de 60 ppm față de martori, atât pentru tumora Walker 256 cât și pentru tumora T8 Guérin. Această lungire a perioadei de latență a influențat procentajul șobolanilor cu tumori la diferite stadii ale evoluției tumorale.

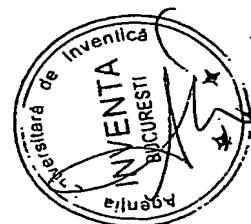


Cu privire la supraviețuirea animalelor s-au constatat următoarele:

- la 60 de zile post inocul tumoral s-a constatat o ușoară prelungire a TMS la animalele grefate cu tumora T8 Guérin la care s-a administrat apă săracită în deuteriu de concentrație 60 ppm și o prelungire semnificativă a TMS la animalele grefate cu tumora Walker 256; la animalele grefate cu tumora Walker 256 și criteriile de apreciere ale activității tumorale au valori semnificative(T/C% = 150 și ILS% = 50);
- la animalele grefate cu tumora Walker 256 la care s-a administrat apă săracită în deuteriu în concentrație de 60 ppm deuteriu, în a 60-a zi mai trăiau 33/79(41%) din şobolani față de 20 % la animalele tratate cu apă săracită în deuteriu la concentrație de 25 ppm deuteriu și 28,5 % la animalele tratate cu apă săracită în deuteriu la concentrație de 100 ppm deuteriu;
- până în a 60-a zi de la inocul tumoral toate animalele martor au murit de cancer;
- la 80 de zile, din 79 şobolani grefați cu tumora Walker 256 și tratați cu apă săracită în deuteriu cu concentrația de 60 ppm deuteriu, mai trăiau 27 şobolani din care 22 fără tumoră, procentul şobolanilor care n-au dezvoltat cancer fiind de 34%;
- pentru tumora T8 Guérin și concentrația de 60 ppm deuteriu, la 184 de zile, au fost 8/77 şobolani(10,4%) care nu au dezvoltat cancer iar 11/77(14,2%) au prezentat o evoluție tumorală foarte lentă;
- la 584 de zile, pentru tumora Walker și concentrația 60 ppm deuteriu, 20/70 şobolani au fost în viață ceea ce reprezintă 28,5%, iar la 8/60(11,1%) din şobolani la care evoluția tumorală a fost foarte mult prelungită.

Aceste rezultate obținute prin aplicarea metodei conform invenției sunt datorate în primul rând modulării celulelor din sistemul imunitar mediat umoral și celular, care determină o inhibiție asupra dezvoltării și evoluției celor două tumoră maligne experimentale(Walker 256 și T8 Guérin). Dovada acestei acțiuni este ilustrată de următoarele:

- la 162 de zile pentru tumora Walker 256 și la 192 de zile pentru tumora T8 Guérin, formula leucocitară la animalele supraviețuitoare cu evoluție tumorală extrem de lentă, prezintă o creștere procentuală a limfocitelor de 70-80 %vs. 15-20% la martori; din procentul limfocitelor 10 – 15 % erau celulele blastice vs. 0% la martori;
- înregistrarea unui procent crescut al celulelor dendritice(5-8 % vs 0 – 1% la martori) și a celulelor NK-K(9-15% vs. 0-1% la martori);
- se constată că măduva hematopoietică a animalelor tratate cu apă săracită în deuteriu la concentrație 60 ppm deuteriu prezintă o masivă infiltrare cu imunoblaști, plasmocite și mastocite, ceea ce dovedește o celularitate specifică pentru reacțiile imune mediate umoral;
- teritoriul limfopoietic prezintă imagini identice cu cele din măduva hematopoietică;



- celularitatea tumorilor cu evoluție extrem de lentă este foarte diferită de cea existentă la martori; astfel, în timp ce la martori celulele tumorale sunt în proporție de aproape 100% din total celularitate, la animalele care au primit în dietă apă săracită în deuteriu, în special cea cu concentrația de 60 ppm deuteriu, pragul acestor celule tumorale nu depășesc 10 %, restul celulelor tumorale fiind în necroboză;
- se remarcă invazia tumorii de către limfocite și celule NK-K.
- analiza citomorfologică a hematopoizei arată o formulă leucocitară cu un procent ridicat de limfocite(60-75%), celule limfoidice-blastice (5-7%), prezența celulelor dendritice(5-8%) și a celulelor NK-K (9-15%) la şobolani care au consumat 1-2 ani în exclusivitate și în mod continuu apă săracită în deuteriu 60 ppm deuteriu.

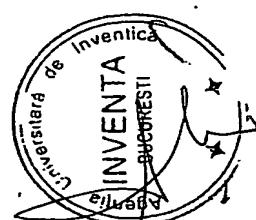
Deci, şobolanii supraviețuitori de cancer au prezentat o remanență pe termen foarte lung a acestei extraordinare stimulări imune prin administrarea continuă de apă săracită în deuteriu 60 ppm deuteriu înainte și după grefarea tumorală.

În baza rezultatelor obținute prin aplicarea metodei conform invenției se poate afirma că, administrarea continuă de apă săracită în deuteriu la concentrație de 60 ppm deuteriu timp de 60 de zile înainte de grefarea tumorală și administrarea acestei ape timp extrem de îndelungat, inhibă dezvoltarea și evoluția celor două tumori maligne experimentale pe şobolani Wistar outbred, producând în final nedezvoltarea cancerului în procente semnificative cât și prelungirea semnificativă a timpului de supraviețuire a animalelor cu tumori, determinând o evoluție foarte lentă.

De asemenea se poate afirma că apa săracită în deuteriu la concentrația de 60 ppm deuteriu administrată continuu și timp îndelungat acționează ca un factor homeostazic de inhibare a dezvoltării și evoluției tumorilor maligne.

Deoarece şobolanii supraviețuitori de cancer au prezentat o remanență pe termen foarte lung a sistemului imunitar în urma administrării continue de apă săracită în deuteriu la concentrație de 60 ppm deuteriu, se poate afirma că apa săracită în deuteriu la concentrația de 60 ppm deuteriu creează o nouă homeostazie la animalele de experiență la care a fost administrată, producând o modulare a celulelor din sistemul imunitar mediat umoral și celular.

Pentru a menține homeostazia indusă de apa săracită în deuteriu este necesar ca administrarea acesteia odată începută să fie continuată indefinit (continuu), fără întreruperi accidentale; în caz contrar, homeostazia instalată se perturbă cu ușurință și se poate reveni la faza homeostazică dinaintea administrării apei săracite în deuteriu, când condițiile homeostazice facilitează din nou proliferarea clonului malign.



REVENDICĂRI

1. Metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animalele de experiență, a concentrației eficiente de apă săracită în deuteriu pentru tratamentul cancerului, caracterizată prin aceea că, prevede administrarea la animale de experiență a apei săracită în deuteriu înainte și după grefarea tumorală cu grefe animale și are următoarele etape:

A) administrarea şobolanilor Wistar outbred prin dietă a apei sărăcită în deuteriu la concentraţiile de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animale martor cărora le-a fost administrată prin dietă apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu pe aceeași durată.

B) Stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate, cu albastru de tripan.

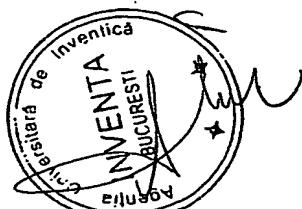
C) Grefarea animalelor din lotul de experiență și animalelor martor, în a 60-a zi, subcutan dorsal, cu 1×10^7 celule tumorale maligne în 0,5 ml ser fiziologic, de sarcom Waker 256- varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guérin -variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%.

D) Administrare continuă și de lungă durată, prin dietă a apei sărăcită în deuteriu la concentrații de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm deuteriu, perioadă în care se efectuează următoarele :

- începând cu ziua a 4-a post-grefare se execută la 2-3 zile controlul și măsurarea nodulilor tumorali;
- urmărirea stării fiziologice a animalelor prin cântărire săptămânală, urmărirea consumului hranei și al apei, observarea apariției toxicității;
- după 60 de zile, când toate animalele martor au decedat, de preferință între ziua 160-200 de la grefare, se urmărește efectul produs de administrarea apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun umoral și celular al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor și anume : analiza formulei leucocitare pentru stabilirea nivelului limfocitelor și a celulelor blastice; analize la nivelul măduvei hematopoietice cât și la nivelul limfonodulilor limitrofi cu grefa tumorală pentru stabilirea cantitativă a nivelului celulelor imunologic competente;

E) Stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu pentru animalele de experiență rămase în viață funcție de instalarea noii homeostazi și de rezultatele obținute privind regresia tumorală, cât și de vindecările de cancer.

2. Metodă, conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că stabilește concentrația de 60 ppm deuteriu în apa săracită în deuteriu, concentrație care este cea mai eficientă pentru tratamentul și profilaxia cancerului prin administrare continuă și de lungă durată a acestei ape în dieta zilnică.



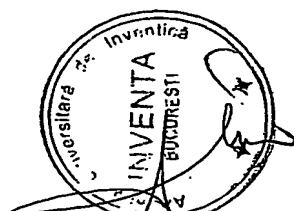
Metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animalele de experiență, a concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu pentru tratamentul cancerului

REZUMAT

Metoda conform invenției prevede administrarea la animale de experiență a apei sărăcită în deuteriu înainte și după grefarea tumorală cu grefe animale și are următoarele etape:

- A) administrarea șobolanilor Wistar outbred prin dietă a apei sărăcită în deuteriu la concentrațiile de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animale martor cărora le-a fost administrată prin dietă apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu pe aceeași durată.
- B) Stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate, cu albastru de tripan.
- C) Grefarea animalelor din lotul de experiență și animalelor martor, în a 60-a zi, subcutan dorsal, cu 1×10^7 celule tumorale maligne în 0,5 ml ser fiziologic de sarcom Waker 256-varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guérin -variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%.
- D) Administrare continuă și de lungă durată, prin dietă a apei sărăcită în deuteriu la concentrații de 25 ppm, 60 ppm și 100 ppm deuteriu, perioadă în care se efectuază următoarele :
 - a. începând cu ziua a 4-a post-grefare se execută la 2-3 zile controlul și măsurarea nodulilor tumorali;
 - b. urmărirea stării fiziologice a animalelor prin cântărire săptămânală, urmărirea consumului hranei și al apei, observarea apariției toxicității;
 - c. după 60 de zile, când toate animalele martor au decesat, de preferință între ziua 160-200 de la grefare, se urmărește efectul produs de administrarea apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun umoral și celular al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor și anume : analiza formulei leucocitare pentru stabilirea nivelului limfocitelor și a celulelor blastice; analize la nivelul măduvei hematopoietice cât și la nivelul limfonodulilor limitrofi cu grefa tumorală pentru stabilirea cantitativă a nivelului celulelor imunologic competente;
- E) Stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu pentru animalele de experiență rămase în viață funcție de instalarea homeostaziei și de rezultatele obținute privind regresia tumorală, cât și de vindecările de cancer.

Metoda stabilește concentrația de 60 ppm deuteriu în apă sărăcită în deuteriu, ca fiind cea mai eficientă pentru tratamentul și profilaxia cancerului prin administrare continuă și de lungă durată a acestei ape în dieta zilnică.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.